(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0094175
(43) 공개일자 2011년08월22일

(51) Int. Cl.
A61K 31/35 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A23L 1/29 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0077935(분할)
(22) 출원일자 2011년08월04일
심사청구일자 2011년08월04일
(62) 원출원 특허 10-2008-0112355
원출원일자 2008년11월12일
심사청구일자 2008년11월12일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교
(72) 발명자
임순성
강원도 춘천시 퇴계동 916-3 그린타운아파트 102동 401호
김정상
대구광역시 수성구 범어1동
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 천지

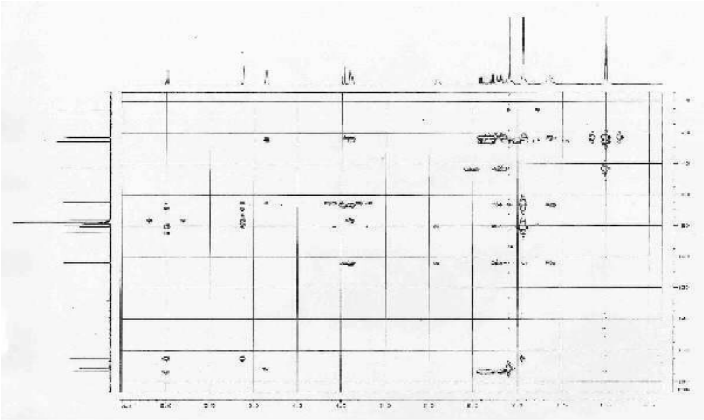
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 퀴논 산화환원효소 유도용 조성물 및 그 용도

(57) 요 약

본 발명은 구절초로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물 및 구절초 추출물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 상기 구절초로부터 분리한 화합물은 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소의 항산화 활성을 유도하는 항산화효소 유도활성이 인정될 뿐만 아니라, 암세포를 이용하여 측정한 항암효과가 뛰어난 것으로 확인되었으므로, 이를 유효성분으로 포함하는 상기 약학 조성물은 암을 치료, 예방 또는 개선하기 위하여 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도3



(72) 발명자

이연실

강원도 춘천시 후평2동 포스코더샵아파트 103동 805호

윤정한

강원도 춘천시 후평1동 846-1 현대맨숀 101동 101호

특허청구의 범위

청구항 1

구절초 노르말 헥산 추출물에 대해 노르말-헥산 및 에틸아세테이트를 부피비를 기준으로 8:2(노르말-헥산:에틸아세테이트)로 혼합한 혼합용매를 전개용매로 이용하여 컬럼 크로마토그래피법을 수행하여 수득한 분획물을 유효성분으로 포함하는 간기능 개선 및 피로회복 촉진용 식품 조성물.

청구항 2

구절초 노르말 헥산 추출물에 대해 노르말-헥산 및 에틸아세테이트를 부피비를 기준으로 8:2(노르말-헥산:에틸아세테이트)로 혼합한 혼합용매를 전개용매로 이용하여 컬럼 크로마토그래피법을 수행하여 수득한 분획물을 유효성분으로 포함하는 암 치료 또는 예방용 의약 조성물.

청구항 3

구절초에 노르말-헥산을 첨가하고 용매추출하여 구절초 노르말 헥산 추출물을 제조하는 단계;

상기 구절초 노르말 헥산 추출물을 감압농축기를 이용하여 45℃에서 감압 농축하여 구절초 추출물의 농축물을 제조하는 단계; 및

상기 구절초 추출물의 농축물에 대하여 노르말-헥산, 에틸아세테이트, 메탄올 및 이들을 혼합한 혼합용매를 전개용매로 이용하여 컬럼 크로마토그래피법을 수행하여, 부피비를 기준으로 8:2(노르말-헥산:에틸아세테이트)로 혼합한 노르말-헥산 및 에틸아세테이트의 혼합용매를 전개용매로 분획된 분획층을 수득하여, 구절초 추출물의 분획물을 제조하는 단계

를 포함하는 간기능 개선 및 피로회복 촉진기능이 우수한 구절초 추출물을 제조하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 구절초 노르말 헥산 추출물을 제조하는 단계는 50℃ 및 1500 psi 압력 조건에서 용매 추출기를 이용하여 수행하는 것이고,

상기 구절초 추출물의 분획물을 제조하는 단계는 플래쉬 컬럼(flash column)을 이용하여 컬럼 크로마토그래피법을 수행하는 것인

간기능 개선 및 피로회복 촉진용 식품 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 구절초로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물 및 구절초 추출물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암의 발생과 암으로 인한 사망은, 의학의 혁신적인 발전에도 불구하고 계속 증가추세에 있다. 세계 보건 기구의 최근 통계 자료에 의하면 전세계적으로 연간 약 1천만명 이상의 새로운 암환자가 발생하는 것으로 알려져 있으며, 우리나라에서도 암은 가장 높은 사망원인이 되고 있다.

[0003] 암화(carcinogenesis)과정은 다단계로 이루어지는 것으로 예상되는데, 각 단계마다 특이적인 분자 또는 세포수준에서의 변화를 수반한다. 상기 암화 과정은 크게 (a) 발암물질에 의해 DNA에 돌연변이가 유도되는 개시단계, (b) 양성 종양 (benign tumor)이 나타나는 촉진단계, (c) 양성종양이 악성종양 (malignant tumor)으로 변환되는 진행단계와 (d) 악성 정도의 증가 및 전이로의 진행단계와 같이 다단계로 진행되는 것으로 추정된다. 암화과정의 개시단계는 비교적 빠르면서 비가역적으로 일어나는 것으로 여겨진다. 상기 암화과정의 개시단계에서는

발암물질의 세포 내로의 이동, 이후 세포내 효소들에 의한 활성화, 반응성이 증가된 중간대사체의 DNA 결합과 비가역적인 DNA 손상 등이 뒤따른다. 따라서 DNA 손상을 차단하여 발암과정을 억제하는 것은 가장 초기적이고 효과적인 방법의 하나이다.

[0004] 이러한 DNA 손상의 차단은 반응성 발암물질의 형성을 억제하거나 제거를 통하여 성취될 수 있다. 대부분의 발암물질의 대사적 활성화는 1상 효소계인 사이토크롬 P450 모노옥시게나제(cytochrome P450 monooxygenase)에 의하여 이루어지며, 이들 산화효소들이 촉매하는 과정을 거쳐 친전자성 반응물질로 활성화된다. 이들 친전자성 대사산물들은 생체 내 존재하는 DNA와 반응하여 돌연변이 및 유전독성을 유발할 수 있다. 한편, 반응성 발암물질의 제거는 상기 반응성이 강한 발암물질과 수용성이 강한 생체 내 분자를 포합(conjugation)시키는데 관여하는 2상 효소계에 의해 주도적으로 수행된다. 따라서, 2상 효소계(항산화효소계)의 유도는 다양한 종류의 친전자성의 산화를 유도하는 독성물질을 세포 내 DNA와 반응하기 전에 세포밖으로 제거시키는 중요한 기전 중 하나가 된다. 대표적인 2상 효소계에는 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소(NAD(P)H:quinone oxidoreductase1; NQO1), 글루타티온 퍼옥시다제(glutathione peroxidase; GPx), 글루타메이트 시스테인 리가제(glutamate cysteine ligase; GCL), 글루타티온 S-트랜스퍼라제(glutathione S-transferase; GST) 또는 초과산화물 불균등화 효소(superoxide dismutase; SOD)들이 있으며, 이들은 여러 가지 천연물에 의하여 발현이 유도된다. 아직 그 기전이 명확하지 않으나, 2상 효소유도 천연물이 세포 내로 들어가 세포질에 존재하는 Nrf2-Keap1의 결합에 영향을 주어 Keap1이 떨어져 나가면, Nrf2 단백질이 핵 내로 들어가 2상 효소계의 항산화반응인자(antioxidant response element; ARE) 또는 친전자성-반응인자(electrophile-responsive element; EpRE)에 작용하여 발현을 증가시킬 것으로 추정된다. 또 다른 예상기전으로 친전자성 천연물 또는 대사물에 의하여 단백질 카이나제 C(protein kinase C; PKC), 포스포이노시톨 3-카이나제(phosphoinositol 3-kinase; PI3K), 마이토젠-활성화 프로테인 카이나제(mitogen-activated protein kinases; MAPKs), ERK1/2, JNK 등 다양한 종류의 카이나제들이 유도되고, 이들에 의하여 Nrf2가 인산화되면 Nrf2가 활성화되어 핵내로의 이동이 촉진되는 기전이 제시되고 있다.

[0005] 이상과 같이 발암원을 포함하는 외인성 독성 화학물질은 상기 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소와 같은 2상 효소들에 의하여 해독화되며, 이들 해독화 효소들의 불완전한 발현은 각종 암에 대한 위험성을 증가시킨다. 따라서, 암을 치료 또는 예방하기 위하여, NAD(P)H:퀴논 산화환원효소의 발현 또는 활성화를 효과적으로 유도할 수 있는 물질의 개발이 요구되고 있다.

[0006] 또한, 상기 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소는 2상 해독효소계의 지표효소로서 이 효소 활성이 증가되면 다른 2상 해독효소계 예를 들어, 글루타티온 S-트랜스퍼라제(glutathione S-transferase; GST), 글루코로닐 트랜스퍼라제(glucuronyl transferase) 및 설포트랜스퍼라제(sulfotransferase)이 동시에 유도되는 것으로 보고되어 있다. 상기 2상 해독효소계의 유전자의 프로모터부위에는 공통적으로 항산화반응인자가 존재하고, 상기 프로모터에 일종의 전사촉진인자인 Nrf2가 결합하면 효소단백질의 합성이 증가하는 것으로 보고되어 있다.

[0007] 따라서, 천연물로부터 분리되어 부작용 등의 위험이 없으면서도, 해독작용의 증가에 따른 간보호 및 피로회복 촉진을 위하여, NAD(P)H:퀴논 산화환원효소의 발현 또는 활성화를 효과적으로 유도할 수 있는 물질의 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 상기와 같은 요구에 부응하기 위하여, 본 발명은 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소의 항산화활성을 효과적으로 유도하여, 다양한 암의 치료, 예방 또는 개선에 유용하고 부작용이 적은 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한, 기존의 항암물질과 달리 식용으로 사용될 수 있는 천연식물에서 비롯하여 부작용 등이 문제되지 아니하고, 안전성이 우수한 구절초 추출물을 유효성분으로 포함하는 약학조성물 또는 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아세틸린계화합물을 유효성분으로 함유하는 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 활성화 조성물을 제공한다. 상기 활성화 조성물은 상기 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소의 발현량을 증가 및/또는 효소 활성을 향상시킬 수 있는 조성물을 의미한다.

[0011] 상기 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 활성화 물질은 체내에서 항암작용을 개선할 수 있고, 항산화효과가 뛰어나며,

해독작용이 우수하므로, 상기 활성화 조성물은 암의 치료 또는 예방용 조성물로 사용될 수 있고, 간 기능 개선 및 피로회복용 건간기능식품 조성물로 사용될 수 있다.

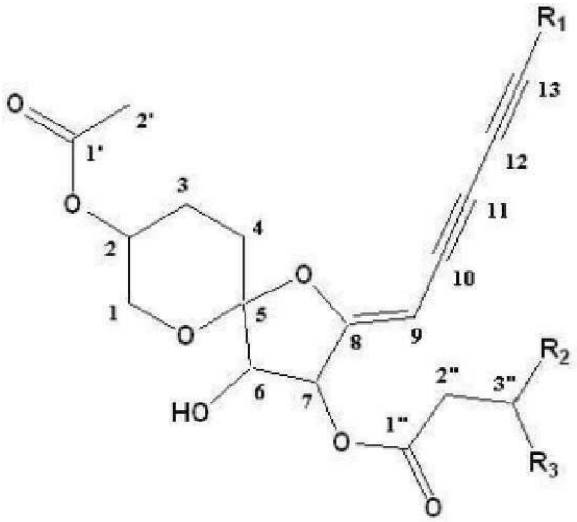
[0012] 또한, 본 발명은 상기 목적을 달성하기 위하여, 구절초 추출물을 유효성분으로 포함하는 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 활성화 조성물 또는 암 치료 또는 예방용 조성물을 제공한다. 상기 구절초 추출물은 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소를 활성화 시킬 수 있어 해독작용이 우수할 뿐만 아니라, 암세포를 이용하여 실험한 결과 우수한 항암활성이 인정되므로, 상기 활성화 조성물은 암의 치료 또는 예방용 조성물로 사용될 수 있고, 간 기능 개선 및 피로회복용 건간기능식품 조성물로 사용될 수 있다. 상기 조성물은 기존의 항암물질과 달리 식용으로 사용될 수 있는 천연식물에서 비롯하여 부작용 등이 문제되지 아니하고, 안전성이 우수하며, NAD(P)H:퀴논 산화환원효소의 활성화 활성 또는 항암 활성이 우수하므로, 상기 조성물은 기존 항암물질 또는 간 기능 개선 및 피로회복용 물질을 대체하여 사용될 수 있다.

[0013] 본 발명자들은 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소가 활성화되는 경우, 항산화작용 뿐만 아니라, 항암작용 또는 간 기능 개선 및 피로회복을 유효하게 유도할 수 있어, NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 활성화물질이 암에 유용한 의약 조성물로 이용할 수 있고, 간 기능 개선 및 피로회복용 조성물로 사용될 수 있다는 점에 착안하여, NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 물질을 조사하던 중, 구절초 추출물 및 구절초 추출물로부터 분리된 본 발명의 아세틸린계화합이 항암효과 및 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 활성화 효과가 뛰어나다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0014] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0015] 본 발명의 한 측면에 있어서, 본 발명은 하기 화학식 1의 구조를 갖는 아세틸린계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 암 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것이다.

[0016] (화학식 1)



[0017]

[0018] 상기 식 중, R_1, R_2 및 R_3는 각각 독립적이고, R_1은 수소, 알킬 및 아릴로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나이고, R_2는 수소 또는 알킬이며, R_3는 수소 또는 알킬일 수 있다. 본 명세서에 있어서, 독립적이란 것은 다른 치환기의 종류에 상관없이 해당 치환기의 종류가 선택될 수 있다는 것을 의미한다.

[0019] 상기 R_1은 탄소수 C1 내지 C5인 알킬, 탄소수 3 내지 7의 시클로 알킬 및 페닐로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나일 수 있고, 바람직하게는 탄소수 C1 내지 C5인 알킬일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 메틸일 수 있다. 또한, 상기 R_2는 탄소수 C1 내지 C5인 알킬, 탄소수 3 내지 7의 시클로 알킬 및 페닐로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나일 수 있고, 바람직하게는 탄소수 C1 내지 C5인 알킬일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 메틸일 수 있다. 또한, 상기 R_3는 탄소수 C1 내지 C5인 알킬, 탄소수 3 내지 7의 시클로 알킬 및 페닐로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나일 수 있고, 바람직하게는 탄소수 C1 내지 C5인 알킬일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 메틸일 수 있다.

[0020] 상기 화합물은 바람직하게는 (+)-(3S,4S,5R,8S)-(E)-8-Acetoxy-4-hydroxy-3-isovaleroyloxy-2-(hexa-2,4-diynyliden)-1,6-dioxaspiro[4,5]decane일 수 있다.

[0021] 본 발명자들은 상기 화합물이 항산화활성이 있고, 항산화반응인자(ARE)에 작용하여 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소의 발현을 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라, 외인성 독성 화학물질을 해독하는 성질을 갖는 2상 효소의 활성을 현저히 유도할 수 있으므로, 해독작용이 우수하여 간 기능 개선 및 피로회복 작용이 우수할 수 있음을 확인하였고, 2상 효소 중 특히 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소를 강력하게 유도할 뿐만 아니라 마우스의 간암세포주인 hepa1c1c7 과 BPRc1에 처치하여 확인한 결과 암세포의 생육을 현저하게 억제할 수 있는 것을 확인하여 우수한 항암효과가 있음을 확인하였다.

[0022] 세포의 암화(carcinogenesis)과정 즉 발암과정 중, 개시단계에서는 발암물질의 세포내로의 이동, 이후 세포내 효소들에 의한 활성화, 반응성이 증가된 중간대사체의 DNA 결합과 비가역적인 DNA 손상 등이 뒤따른다. 따라서 DNA 손상을 차단하여 발암과정을 억제하는 것은 암의 치료 또는 예방에 있어서 가장 초기적이고 효과적인 방법의 하나이다. 상기 DNA 손상의 차단은 반응성 발암물질의 형성을 억제하거나 제거를 통하여 성취될 수 있다. 상기 반응성 발암물질의 제거는 2상 효소계에 의해 주도적으로 수행되므로, 상기 2상 효소계(항산화효소계)의 유도는 다양한 종류의 친전자성의 산화를 유도하는 독성물질을 세포내 DNA와 반응하기 전에 세포 밖으로 제거시키거나 해독화한다. 즉, NAD(P)H:퀴논 산화환원효소를 포함한 2상 효소계의 유도는 체내에서 항암작용을 개선할 수 있고, 해독작용을 향상시킬 수 있으며, 간 기능을 개선하고 피로회복을 촉진시킬 수 있다.

[0023] 따라서, 상기 암은 2상 효소계의 유도에 의하여 치료 또는 예방될 수 있는 모든 종류의 암을 의미하고, 암종(carcinoma)과 육종(sarcoma)을 포함하며, 일 예로 간암, 폐암, 대장암, 유방암, 위암, 자궁경부암 및 백혈병 등일 수 있다.

[0024] 상기 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 활성화 조성물 또는 상기 암 치료 또는 예방용 조성물은 인간을 포함한 동물에 직접 적용될 수 있다. 상기 동물은 식물에 대응하는 생물군으로 주로 유기물을 영양분으로 섭취하고, 소화기관, 배설기관 및 호흡기관이 분화되어 있는 것을 말하며, 바람직하게는 포유류, 더욱 바람직하게는 인간일 수 있다.

[0025] 상기 화학식 1의 구조를 갖는 아세틸린계 화합물은 상기 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 활성화 조성물 또는 암 치료 또는 예방용 조성물 내에 단독으로 사용될 수 있으며, 그 외 약리학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 희석제 또는 부성분을 추가로 포함할 수 있다. 보다 상세하게는, 상기 화학식 1의 구조를 갖는 화합물을 포함하는 조성물이 약제로 사용되거나, 의약 또는 약학적 용도로 사용되는 경우, 상기 화학식 1의 구조를 갖는 아세틸린계 화합물은 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 혼합하거나 희석제로 희석하여 사용될 수 있다.

[0026] 이 경우 상기 조성물 내 상기 화학식 1의 구조를 갖는 아세틸린계 화합물의 함량은 0.001 중량 % 내지 99.9 중량 %, 0.1 중량% 내지 99 중량% 또는 1 중량% 내지 20 중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 조성물의 사용태양 및 사용방법에 따라 상기 화합물의 함량은 바람직한 함량으로 적절히 조절하여 사용될 수 있다.

[0027] 상기 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 덱스트린, 칼슘카보네이트, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀 및 생리시염수로 이루어진 군에서 선택된 1 이상을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 통상의 담체, 부형제 또는 희석제 모두 사용가능하다. 또한, 상기 약학 조성물은 통상의 충진제, 증량제, 결합제, 붕해제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, pH 조절제, 영양제, 비타민, 전해질, 알긴산 및 그의 염, 펙트산 및 그의 염, 보호성 콜로라이드, 글리세린, 향료, 유화제 또는 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 성분들은 상기 유효성분인 상기 화학식 1의 구조를 갖는 아세틸린계 화합물에 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명의 조성물은 상기 유효성분 이외에 공지의 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 활성화 물질 또는 항암제로 사용되는 물질을 더욱 포함할 수 있다.

[0029] 상기 조성물이 약제로 사용하는 경우 투여방법은 경구 또는 비경구 모두 가능하며, 일 예로는 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다.

[0030] 또한, 상기 조성물의 제형은 사용방법에 따라 달라질 수 있으며, 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 본 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 일반적으로는, 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제(TABLETS), 알약, 연질 또는 경질 캅셀제(CAPSULES), 환

제(PILLS), 산제(POWDERS) 및 과립제(GRANULES) 등이 포함되고, 이러한 제제는 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제(SUSTESIONS), 내용액제, 유제(EMULSIONS) 및 시럽제(SYRUPS) 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0031] 비경구투여를 위한 형태는 크림(CREAM), 로션제(LOTIONS), 연고제(ONITMENTS), 경고제(PLASTERS), 액제(LIQUIDS AND SOULTIONS), 에어로솔제(AEROSOLS), 유동엑스제(FRUIDEXTRACTS), 엘릭서(ELIXIR), 침제(INFUSIONS), 향낭(SACHET), 패취제(PATCH) 또는 주사제(INJECTIONS) 등의 형태일 수 있다.

[0032] 더 나아가, 본 발명의 조성물은 당해 기술 분야의 공지된 적절한 방법을 사용하여 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 제형화될 수 있다.

[0033] 상기 조성물의 투여량은 투여방법, 복용자의 연령, 성별, 환자의 중증도, 상태, 체내에서 활성 성분의 흡수도, 불활성율 및 병용되는 약물을 고려하여 결정할 수 있으며, 일 예로 1일 유효성분을 기준으로 하였을 때 0.1 mg/kg(체중) 내지 500 mg/kg(체중), 0.1 mg/kg(체중) 내지 400 mg/kg(체중) 또는 1 mg/kg(체중) 내지 300 mg/kg(체중)으로 투여할 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0034] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1의 구조를 갖는 아세틸린계 화합물 또는 상기 화합물의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 활성화 조성물에 관한 것이다.

[0035] 상기 화학식 1의 구조를 갖는 아세틸린계 화합물은 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소를 활성화시키는 것으로 확인되었고, 상기 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소가 활성화되는 경우, 다른 2상 해독효소계 예를 들어, 글루타티온 S-트랜스퍼라제(glutathione S-transferase; GST), 글루코로닐 트랜스퍼라제(glucuronyl transferase) 또는 설포트랜스퍼라제(sulfotransferase) 등이 활성화될 수 있는 것으로 보고되어 있다. 상기 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소는 항산화반응인자(ARE)를 포함하는 ARE-luciferas 구조체가 형질전환된 세포주를 이용한 실험에서 리포터 유전자인 루시퍼라제의 발현량을 증가시키는 것으로 확인되었고, 상기 항산화반응인자의 증가는 상기 2상 해독효소계의 효소단백질의 합성을 증가시킬 수 있는 Nrf2와도 관계가 있는 것으로 예상된다. 그러므로, 상기 화학식 1의 구조를 갖는 아세틸린계 화합물은 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소를 활성화시켜, 간에 들어오는 각종 독성물질의 해독반응을 가속화할 수 있으므로, 간기능 개선, 간보호 및 피로회복 촉진 등과 같은 효과가 있는 것으로 확인되었다.

[0036] 따라서, 상기 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 활성화 조성물은 간기능 개선, 간보호 또는 피로회복 촉진을 위한 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있다.

[0037] 이러한 측면에서, 본 발명은 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 활성화 조성물을 유효성분으로 포함하는 간기능 개선 및 피로회복 촉진용 식품 조성물을 제공한다.

[0038] 또한, 본 발명은 상기 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 활성화 조성물을 유효성분으로 포함하는 간기능 개선 및 피로회복 촉진용 식품 조성물일 수 있다. 본 발명의 식품 조성물의 예로는 식품, 식품첨가제, 음료 또는 음료첨가제를 들 수 있다.

[0039] 상기 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 활성화 조성물을 유효성분으로 포함하는 간기능 개선 및 피로회복 촉진용 식품 조성물은 그 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0040] 본 명세서에서 식품이란 함은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 건강 기능성 식품 및 음료를 모두 포함하는 의도이다.

[0041] 본 발명의 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 활성화 조성물이 포함될 수 있는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본 발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영,유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스넥류), 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과실,채소류 음료, 두유류, 발효음료류, 아

이스크림류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등), 비타민 복합제, 알코올 음료, 주류 및 그 밖의 건강보조식품류를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[0042] 본 발명에서 기능성 식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다. 상기 기능성 식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0043] 본 발명에서 음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 기능성 음료를 포함하는 의도이다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 활성화 조성물을 유효성분으로 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기의 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100㎖ 당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 5 내지 12g일 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일 주스, 과일 쥬스 음료, 야채 음료의 제조를 위한 과육을 추가로 함유할 수 있다.

[0044] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분을 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 상기 첨가제는 본 발명의 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 활성화 조성물 100 중량부 당 0 내지 20 중량부, 바람직하게는 0.00001 내지 15 중량부 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0045] 본 발명에서 기능성 음료란 음료에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 음료의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 음료 군이나 음료 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 음료를 의미한다.

[0046] 상기 기능성음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 본 발명의 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 활성화 조성물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 중량부 내지 20 중량부, 바람직하게는 1 중량부 내지 18 중량부, 더욱 바람직하게는 5 중량부 내지 12 중량부 포함될 수 있다.

[0047] 또한, NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 활성화 조성물을 유효성분으로 포함하는 간기능 개선 및 피로회복 촉진용 식품 조성물에 있어서, 상기 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 활성화 조성물의 양은 전체 식품 중량의 0.00001 중량% 내지 50 중량%로 포함될 수 있으며, 음료 조성물의 경우 식품 전체의 부피 100 ml를 기준으로 0.001 g 내지 50 g, 바람직하게는 0.01 g 내지 10 g의 비율로 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0048] 또한, 본 발명은 구절초 추출물을 유효성분으로 포함하는 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 활성화 조성물 또는 구절초 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것이다.

[0049] 본 발명에서 구절초(*Chrysanthemum zawadskii*)는 초롱꽃목 국화과의 여러해살이풀로, 쌍떡잎 식물이며 구절초, 구일초, 선모초, 들국화 또는 고뿡이라고도 한다. 일 예로, 구절초(*Chrysanthemum zawadskii* var. latilobum Kitamura), 바위구절초(*Chrysanthemum zawadskii* Herb. ssp. acutilobum {DC.} Kitagawa var. alpinum {Nakai} Y. Lee), 가는잎구절초(*Chrysanthemum zawadskii* Herbich ssp. acutilobum {DC.} Kitagawa), 한라구절초(*Chrysanthemum zawadskii* Herb. ssp. coreanum {Nakai} Y. Lee)를 포함한다. 상기 구절초는 꽃, 줄기 및 잎으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상을 포함하는 지상부 또는 뿌리일 수 있고, 바람직하게는 지상부일

수 있다. 상기 구절초는 여름과 가을 사이에 채취하여 햇볕에 말린 지상부일 수 있다.

[0050] 상기 구절초 추출물은 추출용매 또는 추출용매 및 분획용매를 이용하여 추출 또는 추출 및 분획하여 제조할 수 있다.

[0051] 상기 추출용매는 물 또는 메탄올, 에탄올 등의 탄소수 1 내지 5의 알코올, 에틸아세테이트 등의 극성용매와 헥산, 메틸렌 클로라이드, 클로로포름 또는 디클로로메탄의 비극성용매와 같은 유기용매 또는 이들의 혼합용매일 수 있으며, 바람직하게는 헥산, 메틸렌 클로라이드, 클로로포름 또는 디클로로메탄의 비극성용매, 더욱 바람직하게는 헥산일 수 있다. 상기 헥산은 일 예로 노르말-헥산(n-Hexane)일 수 있다. 또한, 상기 구절초 추출물은 추출용매로 제조된 조추출물일 수 있으며, 상기 조추출물은 바람직하게는 비극성 추출용매 또는 노르말-헥산(n-Hexane)으로 추출한 비극성 추출물일 수 있다.

[0052] 상기 분획용매는 물 또는 메탄올, 에탄올 등의 탄소수 1 내지 5의 알코올, 에틸아세테이트 등의 극성용매와 헥산 또는 디클로로메탄의 비극성용매와 같은 유기용매 또는 이들의 혼합용매일 수 있다. 일 예로, 상기 극성 용매 또는 비극성 용매는 탄소수 1 내지 5의 알코올, 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 아세톤, 메틸렌 클로라이드, 이들의 희석수 또는 이들의 혼합물일 수 있다.

[0053] 상기 분획용매는 노르말 헥산, 에틸아세테이트 및 메탄올로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 노르말-헥산 및 에틸아세테이트로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 노르말-헥산과 에틸아세테이트가 9:1 내지 7:3(노르말-헥산:에틸아세테이트) 또는 8.5:1.5 내지 7.5:2.5로 혼합된 혼합용매일 수 있다.

[0054] 상기 분획물은 바람직하게는 구절초의 비극성 추출물에 대하여 노르말 헥산, 에틸아세테이트 및 메탄올로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 전개용매를 사용하여 제조된 분획물일 수 있다.

[0055] 상기 분획법은 상기 전개용매를 이용한 크로마토그래피법일 수 있으며, 일 예로 디아니온 크로마토그래피(Dianion Chromatography)법일 수 있다. 또한, 상기 컬럼은 flash column일 수 있다. 상기 이동상에 해당하는 전개용매는 극성에 따라 순차적으로 극성이 낮은 용매로 치환시킬 수 있다.

[0056] 본 발명의 구절초 추출물을 제조하는 방법은 구절초 분쇄시료에 추출용매인 비극성 용매, 바람직하게는 노르말-헥산을 첨가하고 추출과정을 수행하는 것일 수 있다.

[0057] 상기 추출과정은 기기 추출법 또는 기기 추출법일 수 있으며, 바람직하게는 기기 추출법일 수 있다. 상기 초음파 추출법은 일 예로 분쇄시료 10g을 기준으로 노르말-헥산50 내지 200ml, 바람직하게는 75 내지 150ml, 더욱 바람직하게는 90 내지 125ml를 첨가하고, 30 내지 80℃, 바람직하게는 40 내지 60℃의 조건에서 5 내지 90분, 바람직하게는 10 내지 60분, 더욱 바람직하게는 15 내지 45분 동안 추출하는 방법으로 수행할 수 있다. 또한, 상기 기기 추출법은 일 예로 분쇄시료 10g을 기준으로 노르말-헥산30 내지 200ml, 바람직하게는 50 내지 150ml, 더욱 바람직하게는 60 내지 100ml를 첨가하고, 30 내지 70℃, 바람직하게는 40 내지 60℃ 및 1000 내지 1800 psi, 바람직하게는 1200 내지 1700 psi, 더욱 바람직하게는 1400 내지 1600 psi의 조건에서 5 내지 60분, 바람직하게는 10 내지 40분, 더욱 바람직하게는 15 내지 30분 동안 추출하는 방법으로 수행할 수 있다.

[0058] 상기 구절초 분쇄시료는 유수로 세척한 구절초를 건조시킨 후, 분쇄기로 분쇄하여 제조할 수 있다. 상기 추출물은 수득된 추출과정을 수행하여 제조된 조추출액에 대해 여과과정을 수행하거나 농축 및/또는 동결건조를 수행하여 제조할 수 있다. 상기 여과과정을 수행하여 추출액에 남아 있는 잔사 등을 제거할 수 있으며, 상기 농축 및/또는 동결건조를 수행하여 수분을 제거할 수 있다. 또한, 상기 농축은 감압농축기를 이용하여 수행할 수 있으며, 상기 감압농축 과정은 30 내지 70℃, 바람직하게는 40 내지 50℃의 조건에서 수행할 수 있다.

[0059] 본 발명에 따른 구절초 추출물 또는 구절초 분획물은 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소를 활성화시키고, 항암 활성이 우수할 뿐만 아니라, 식용으로 사용될 수 있는 천연식물을 이용하여 제조한 것이므로 부작용 등이 문제되지 아니하고, 안전성이 우수하므로, 상기 구절초 추출물은 암의 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물 또는 간 기능 개선 및/또는 피로회복용 조성물로 사용될 수 있다.

[0060] 상기 구절초 추출물은 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소를 활성화시켜, 암화과정의 개시단계에서 반응성이 강한 발암물질과 수용성이 강한 생체내 분자를 포합(conjugation)시켜, 발암물질을 제거함으로써 암의 치료 또는 예방에 효과적일 뿐만 아니라, 항산화효소를 활성화시켜 친전자성의 산화를 유도하는 독성물질을 제거함으로써 외인성 독성 화학물질을 해독할 수 있다.

[0061] 본 발명의 구절초 추출물을 유효성분으로 포함하는 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 활성화 조성물은 구절초 추출물

을 단독으로 포함할 수 있으며, 이외 제형, 사용방법 및 사용목적에 따라 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0062] 본 발명의 구절초 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 치료 또는 예방용 조성물은 구절초 추출물을 단독으로 포함할 수 있으며, 이외 제형, 사용방법 및 사용목적에 따라 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0063] 상기 구절초 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 치료 또는 예방용 조성물에 유효성분인 상기 구절초 추출물 외에 다른 성분이 첨가된 혼합물로 제공되는 경우, 상기 구절초 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 치료 또는 예방용 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 구절초 추출물을 0.001 중량% 내지 99.9 중량%, 바람직하게는 0.1 중량% 내지 99 중량 %, 더욱 바람직하게는 1 중량% 내지 50 중량% 포함할 수 있다.

[0064] 상기 담체, 부형제 또는 희석제는 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자이리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아키시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀루로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 덱스트린, 칼슘카보네이드, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀, 생리식염수로 이루어진 군에서 선택된 1이상 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 통상의 담체, 부형제 또는 희석제 모두 사용가능하다.

[0065] 또한 상기 구절초 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 치료 또는 예방용 조성물을 약제화하는 경우, 통상의 충진제, 증량제, 결합제, 붕해제, 계면활성제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 또는 방부제 등을 더욱 포함할 수 있으며, 경구 또는 비경구 모두 사용 할 수 있으나, 바람직하기로는 경구 투여용으로 할 수 있다. 구체적으로 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0066] 본 발명의 구절초 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 치료 또는 예방용 조성물의 제형은 사용방법에 따라 바람직한 형태일 수 있으며, 특히 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 채택하여 제형화할 수 있다. 구체적인 제형의 예로는 경고제, 과립제, 로션제, 리니멘트제, 리모나데제, 산제, 시럽제, 안연고제, 액제, 에어로솔제, 엑스제(EXTRACTS), 엘릭실제, 연고제, 유동엑스제, 유제, 현탁제, 전제, 침제, 점안제, 정제, 좌제, 주사제, 주정제, 캅셀제, 크림제, 환제, 연질 또는 경질 젤라틴 캅셀 등이 있다.

[0067] 본 발명에 따른 구절초 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 치료 또는 예방용 조성물의 투여량은, 투여방법, 복용자의 연령, 성별 및 체중, 및 질환의 중증도 등을 고려하여 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 일예로, 본 발명의 구절초 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 치료 또는 예방용 조성물은 구절초 추출물을 기준으로 할 때, 0.0001 mg/kg 내지 1000 mg/kg으로, 보다 효과적이기 위해서는 0.01 mg/kg 내지 100 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0068] 또한, 본 발명의 구절초 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 치료 또는 예방용 조성물은, 구절초 추출물 이외에 공지의 항암효과를 갖는 화합물 또는 식물 추출물을 더욱 포함할 수 있으며, 구절초 추출물 100 중량부에 대하여 각각 5 중량부 내지 20 중량부로 포함될 수 있다.

[0069] 또한, 본 발명은 상기 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 활성화 조성물을 유효성분으로 포함하는 간기능 개선 및 피로회복 촉진용 식품 조성물일 수 있다. 본 발명의 식품 조성물의 예로는 식품, 식품첨가제, 음료 또는 음료첨가제를 들 수 있다.

[0070] 상기 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 활성화 조성물을 유효성분으로 포함하는 간기능 개선 및 피로회복 촉진용 식품 조성물은 그 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0071] 본 명세서에서 식품이란 함은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서,

식품, 식품 첨가제, 건강 기능성 식품 및 음료를 모두 포함하는 의도이다.

[0072] 상기 기능성 식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다. 또한, 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 활성화 조성물을 유효성분으로 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분을 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 상기 첨가제는 본 발명의 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 활성화 조성물 100 중량부 당 0 내지 20 중량부, 바람직하게는 0.00001 내지 15 중량부 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0073] 또한, NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 활성화 조성물을 유효성분으로 포함하는 간기능 개선 및 피로회복 촉진용 식품 조성물에 있어서, 상기 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 활성화 조성물의 양은 전체 식품 중량의 0.00001 중량% 내지 50 중량%로 포함될 수 있으며, 음료 조성물의 경우 식품 전체의 부피 100 ml 를 기준으로 0.001 g 내지 50 g, 바람직하게는 0.01 g 내지 10 g의 비율로 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0074] 본 발명의 구절초 추출물 및 구절초 추출무로부터 수득된 아세틸린계 화발물은 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소를 활성화시키고, 항암활성이 뛰어난 것으로 확인되었으므로, 암의 치료 또는 예방 효과와 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 활성화에 따른 외래에서 유입된 독성물질이나 발암물질의 분해 등과 관련된 해독작용이 우수할 뿐만 아니라, 천연물로부터 분리되어 부작용 이나 내성 등과 관련된 문제점이 없으므로, 암의 치료 또는 예방이나, 간보호, 간기능개선 또는 피로회복촉진 등과 관련하여 널리 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0075] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 구절초 노르말-헥산 추출물 분획물의 항산화/해독효소계인 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소의 활성화 정도를 측정한 그래프로, 도 1a는 Hepa1c1c7 세포주를 이용하여, 구절초 노르말-헥산 추출물 분획물의 항산화/해독효소계인 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소의 활성화 정도를 측정한 그래프이고, 도 1b는 BPRc1 세포주를 이용하여, 구절초 노르말-헥산 추출물 분획물의 항산화/해독효소계인 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소의 활성화 정도를 측정한 그래프이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, ARE-luciferase 유전자가 형질전환된HepG2-C8을 이용하여, 구절초 노르말-헥산 추출물 분획물의 형광활성(luciferase activity)를 확인한 그래프이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른, 구절초 노르말-헥산 추출물 분획물의 유효성분인 본 발명의 화학식을 갖는 아세틸린계 화합물의 Heteronuclear Multiple Bond Correlation experiment(HMBC) NMR 결과를 확인한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0076] 이하, 본 발명의 바람직한 실시예를 기재한다. 다만, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0077] **<실시예 1> 구절초추출물 및 분획물의 제조**

[0078] 구절초(*Chrysanthemum zawadskii* var. latilobum Kitamura)의 꽃 등의 지상부 3kg을 흐르는 물에 씻은 후, 햇볕에 말렸다. 햇볕에 말린 구절초를 분쇄기를 이용하여 분쇄한 후, 상기 분쇄시료에 추출용매를 가하고 기기 추출법과 초음파 분쇄법으로 추출하였으며, 상기 추출용매는 노르말-헥산을 사용하였다.

[0079] 상기 초음파 추출법은 초음파 추출기(BRANSON Ultrasonics corporation)를 이용하여 수행하였으며, 보다 구체적으로는 상기 분쇄시료 100 g에 노르말-헥산 1L를 첨가하고, 50℃에서 30분간 추출하는 방법으로 수행하였다. 한편, 상기 기기 추출법은 추출기(ASE 300 ACCELERATED SOLVENT EXTRACTOR)를 이용하여 수행하였고, 보다 구체적으로는 상기 분쇄시료 30 g에 노르말-헥산 200 ml를 첨가하고, 50℃ 및 1500 psi 압력의 조건에서 20분간 추

출하는 방법으로 수행하였다. 상기 추출법에 의해 제조된 각 추출물은 감압농축기를 이용하여 45℃에서 감압농축하였다.

[0080] 상기 기기 추출법에 의해 제조된 농축물은 3.5g이고, 초음파 추출법에 의해 제조된 농축물을 8.3 g인 것으로 확인되어, 상기 기기 추출법이 추출수율이 초음파 추출법에 비하여 약 40%의 수율이 더 뛰어난 것으로 확인되다. 상기 실험결과로부터 수율을 최대화할 수 있고, 제조시간과 용매 소비량을 감소시킬 수 있는 장점이 있는 ASE 추출기를 이용한 추출법이 다른 추출법에 비하여 우수한 것으로 확인되었다.

[0081] 상기 기기 추출법에 의해 제조된 농축물에 대하여 flash column(Hi-Flash column, silica gel 40 mg, 165 g, 48×70 mm, 4 L, Yamazen corporation, 일본)을 이용하여 크로마토그래피법을 수행하여 분획물을 제조하였다. 상기 크로마토그래피는 2차례의 flash column을 이용하여 수행하였다. 상기 분획과정은 노르말-헥산, 에틸 아세테이트 및 메탄올을 극성에 따라 농도구배(gradient)를 주면서 전개시켜 분획하였고, 보다 상세하게는 노르말-헥산, 에틸 아세테이트 및 메탄올 순으로 노르말-헥산 10:0에서 에틸아세테이트와 메탄올 혼합용매(5:5) 부피비율이 되도록 수행하였다. 전개를 시작한 후, 총 14개의 분획을 수득하였으며, 각 분획을 감압 농축하였다.

[0082] 상기 감압농축한 분획 농축물을 이용하여 항암활성 및 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 활성화를 측정하였다.

[0083] **<실시예 2> 구절초 추출물(분획물)의 암세포에 대한 생육 억제활성의 확인**

[0084] 상기 실시예 1에서 제조된 구절초 분획 농축물의 암세포에 대한 생육 억제활성 즉, 항암활성을 확인하기 위하여, NCI protocol에 기초하여 MTT assay를 수행하였으며, 암세포주는 마우스 감암세포주인 Hepa1c1c7 세포주와 BPRc1 세포주를 이용하였다.

[0085] 각각의 암세포주에 실시예 1에서 제조된 여러 농도의 시료를 48시간 동안 처리한 후, 50% trichloroacetate(TCA)를 적가하여 세포를 고정하였다. 이후, 증류수를 이용하여 고정된 세포를 4 내지 5회 세척한 후, 1% acetic acid에 용해시키고, 0.4% sulforhodamine B(SRB)를 가하고 30분 동안 방치하였다. 상기 30분간의 방치 후, 1% acetic acid를 이용하여 방치하였된 세포를 4 내지 5회 세척한 후, 10 mM Tris(pH 10.5)를 가하여 SRB를 용해시킨 다음 540 nm에서 흡광도를 측정하여 성장 억제효과를 확인하였다. 상기 시료의 암세포 성장에 대한 억제효과는 배지만 처리한 군을 대조군으로 하여, 세포증식율 50% 저해 농도(IC_{50})로 산출하여 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0086] 구절초 분획의 마우스간암세포 생육억제 활성

분획 번호	IC50(㎍/ml)	
	hepa1c1c7 세포주	BPRc1 세포주
1	>100	>100
2	71	59
3	42	23
4	10	10
5	13	10
6	28	17
8	8	6
9	10	15
12	71	66
14	>100	>100

[0087] 상기 표 1에 나타낸 바와 같이, 시료 즉 상기 실시예에서 제조된 거의 대부분의 분획물은 IC_{50} 값이 100 mg/ml 이하인 것으로 나타나, 매우 우수한 암세포에 대한 세포 독성, 즉 항암 활성이 있는 것으로 확인되었다.

[0088] **<실시예 3> 구절초 추출물(분획물)의 항산화효소계 활성화 효과(유도활성)의 확인**

[0089] 상기 실시예 1에서 제조된 구절초 분획 농축물의 항산화효소계 활성화 효과를 확인하기 위하여, 마우스 감암 세포주인 Hepa1c1c7 세포주와 BPRc1 세포주를 이용하였다.

[0090] 상기 실시예 1에서 제조된 분획 농축물과 양성 대조군(비교예)으로서 항산화제인 t-HBQ(tertiary butylhydroquinone)을 각 분획 농축물에 적합한 농도(5 mg/ml, 10 mg/ml, 25 mg/ml 및 50 mg/ml)로 처치하고, 상기 세포주 내 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소(NQO1)의 활성화 정도를 측정하여 도 1에 나타내었다.

[0091] 상기 도 1a에 나타낸 바와 같이, 실시예 1의 분획 농축물 모두가 항산화효소 NQO1 활성을 유도할 수 있는 것으로 확인되어, 산화환원효소의 활성을 유도할 수 있는 것으로 확인되었고, 4번, 5번, 6번 및 12번 등에서 우수한 산화환원효소 활성화 효과가 확인되었다. 특히, 항암활성이 우수한 것으로 확인된 4번, 5번 및 6번 분획물의 경우에는 적은 함량을 투여한 경우에도 우수한 NQO1 활성화 효과가 있는 것으로 확인되었다.

[0092] 또한, 상기 도 1b에 나타낸 바와 같이, 다수의 분획물에서 산화환원효소의 활성이 유도되었고, 5번, 6번 및 12번 등에서 우수한 산화환원효소 활성화 효과가 확인되었다. 특히 5번과 6번 분획물의 경우에는 적은 함량을 투여한 경우에도 우수한 NQO1 활성화 효과가 있는 것으로 확인되었다.

[0093] 뿐만 아니라, 상기 도 1b에서 확인되 바와 같이, arylhydrocarbon receptor nuclear translocator(ARNT)가 결여된 BPRc1 세포주에서도 우수한 NQO1 활성화 효과가 확인되어, 단기능성 유도제(monofunctional inducer)로서의 작용을 나타내는 것으로 확인되었다. 1상효소계 및 2상효소계에 모두 영향을 미치는 단기능성 유도제와 달리 1상효소계를 유도하지 않고, 2상효소계만을 선택적으로 활성화시키는 단기능성 유도제는 전발암성물질(procarcinogens)의 생성은 그대로 유지하면서, 독성물질 특히 발암성 물질의 대사를 촉진할 수 있으므로, 상기 구절초 분획물은 간보호, 해독 및 암의 치료 또는 예방에 있어서 우수한 효과를 가질 것으로 예상되었다.

[0094] **<실시예 4> 구절초 추출물(분획물)의 항산화효소계 활성화 유도 기전의 확인**

[0095] 상기 실시예 1에서 제조된 구절초 분획 농축물의 항산화효소계 활성화 유도 기전 보다 구체적으로, 유전자 내 전이활성화 시스-단위(transcriptional activation cis-element)인 항산화반응인자(antioxidant response element; ARE)와 연관이 있는지 여부를 확인하기 위하여, ARE-루시퍼라제 조립체(ARE-luciferase construct)로 형질전환된 마우스 간암 세포주인 HepG2-C8 세포주를 이용하였다.

[0096] 상기 실시예 1에서 제조된 분획 농축물과 양성 대조군(비교예)으로서 항산화제인 t-HBQ(tertiary butylhydroquinone)을 각 분획 농축물에 적합한 농도(5mg/ml, 10mg/ml, 25mg/ml 및 50mg/ml)로 처치하고, 리포터 유전자(reporter gene)인 루시퍼라제의 발현정도를 측정하고 비교예인 t-HBQ와 대조예와 비교하여 도 2에 나타내었다.

[0097] 상기 도 2에 나타낸 바와 같이, 대부분의 분획물에서 루시퍼라제를 발현시켰으며, 상기 결과에 의하여, ARE 즉 항산화반응인자의 발현을 촉진할 수 있는 것으로 확인되었다. 특히, 상기 실시예에서도 우수한 것으로 확인된 6번 분획의 경우, 다른 분획뿐만 아니라 비교예보다도 현저하게 많은 량의 루시퍼라제를 발현시켜 유도활성이 가장 우수한 것으로 확인되었고, 다음으로 3번 분획 및 12번 분획 순으로 유도활성을 나타내었다.

[0098] **<실시예 5> 유효성분의 분리 및 정제**

[0099] 상기 실시예 2 내지 4에서 검토한 결과, 우수한 것으로 확인된 6번 분획을 재결정하여, 아세틸린계 화합물을 수득하였다. 6번 분획물은 노르말-헥산과 에틸아세테이트가 8:2(노르말-헥산:에틸아세테이트)의 비율에서 분리된 것이다. 상기 화합물에 대해 질량 분석 및 Heteronuclear Multiple Bond Correlation experiment(HMBC) NMR 분석(1H-NMR 및 13C-NMR)을 수행하여, 구조를 결정하였으며, NMR 분석 결과를 도 3에 나타내었다.

[0100] 상기 도 3에 나타낸 바와 같이, OH(3450 cm^{-1}), C=C(2229 cm^{-1} 및 2139 cm^{-1}), 에스테르 그룹(C=O, 1733 cm^{-1})의 특징적인 기능기를 가지고 있고, 1H-NMR 및 13C-NMR 및 DEPT를 수행한 결과 에스터 카보닐 그룹(ester carbonyl group)과 이중결합으로 연결된 탄소를 포함한 21개의 탄소가 존재하는 것으로 확인되었고, 한 개의 olefinic signal이 확인되었다. HMBC와 HMOC 스펙트럼 데이터를 종합해 본 결과, tetrahydrofurane/tetrapyrane spiroacetal unit, 두 개의 에스터 잔기, C6 diyne-ylidene잔기를 가지며, OH는 C-6, ester moiety는 C-2 및 C-7에 위치하는 (+)-(3S,4S,5R,8S)-(E)-8-Acetoxy-4-hydroxy-3-isovaleroyloxy-2-(hexa-2,4-diynyliden)-1,6-dioxaspiro[4,5]decane로 동정되었다. 상기 실험결과에 대한 상세 내용은 하기

와 같다.

[0101] 명칭 : (+)-(3S,4S,5R,8S)-(E)-8-Acetoxy-4-hydroxy-3-isovaleroyloxy-2-(hexa-2,4-diynyliden)-1,6-dioxaspiro[4,5]decane

[0102] 화학식(Molecular formula) : $C_{21}H_{26}O_7$ (390.1679)

[0103] 성상 : Yellowish oil

[0104] $[]_D$: +62° (c, 5.66; $CHCl_3$)

[0105] IR max(KBr) : 3450(OH), 2229, 2139(C=C), 1733(ester C=O), 1650(C=C) cm^{-1}

[0106] UV max(MeOH): 216, 224, 250, 263, 279, 291 nm

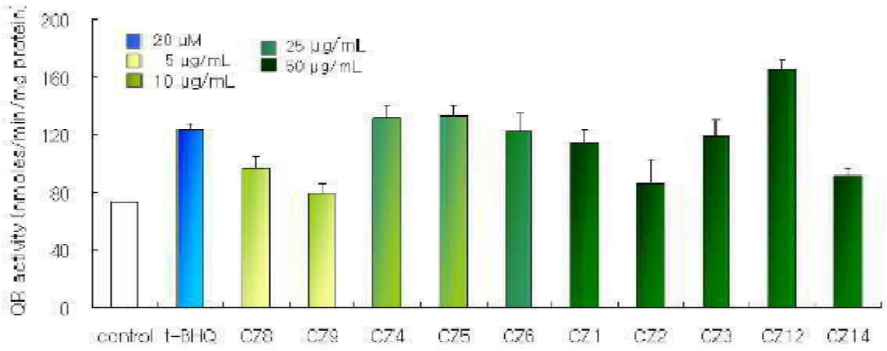
[0107] EI-MS m/z (% rel. int) : 390 (M^+, 25), 372(M^+-H_2O, 12), 306(M^+-C_5H_8O, 2), 288 (M^+-$C_5H_{10}O_2$, 100), 246(74), 228(32)

[0108] 13C-NMR($CDCl_3$) : 64.9(C-1), 66.3(C-2), 23.2(C-3), 25.2(C-4), 103.9(C-5), 80.0(C-6), 76.2(C-7), 164.5(C-8), 84.6(C-9), 68.8(C-10), 78.8(C-11), 65.0(C-12), 80.7(C-13), 5.0(C-14), 173.1(C-1´), 43.0(C-2´), 25.8(C-3´), 22.8, 22.9(C-4´, 5´), 171.0(C-1"), 21.6(C-2")

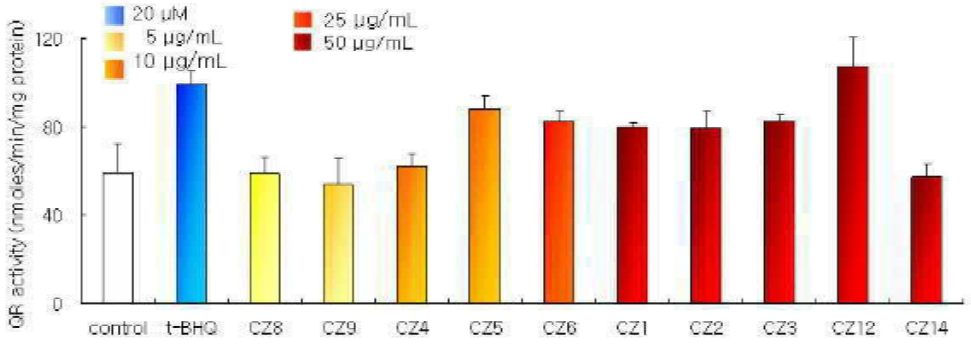
[0109] 1H-NMR ($CDCl_3$) : 3.90, 3.98(H-1), 4.87(H-2), 1.92, 2.07(H-3), 1.62, 2.21 (H-4), 3.91(H-6), 6.01(H-7), 5.13(H-9), 1.95(C-14), 2.32, 2.40(H-2´), 2.19(H-3´), 0.99, 1.0(H-4´, 5´), 2.17(H-2")

도면

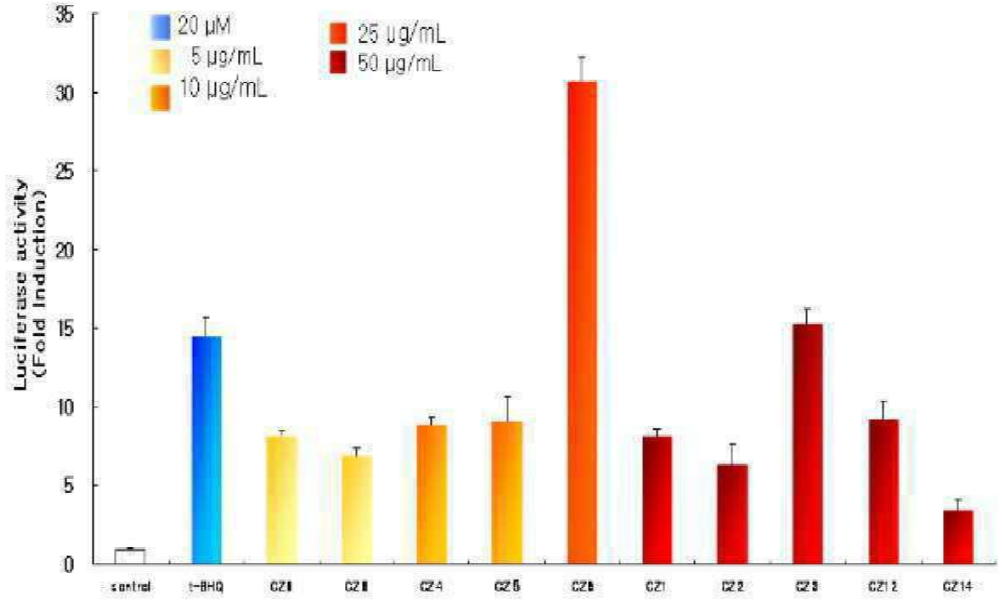
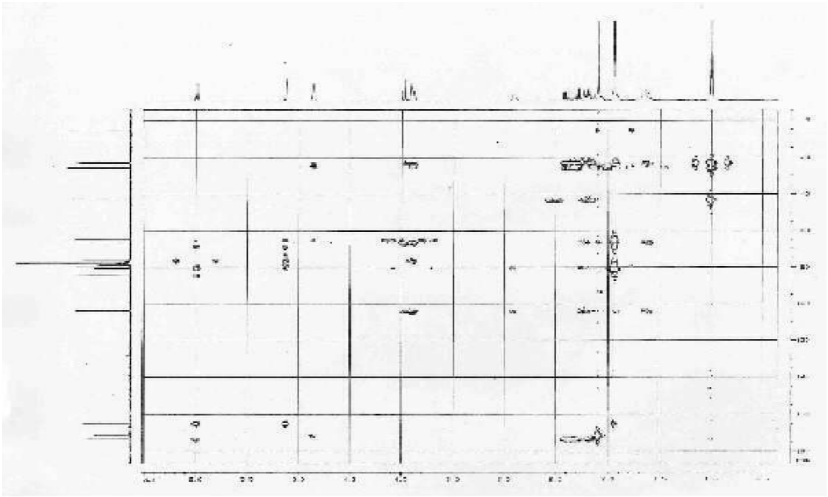
도면1a



도면1b


20 μM
5 μg/mL
10 μg/mL
25 μg/mL
50 μg/mL
QR activity (nmoles/min/mg protein)
120
80
40
0
control
t-BHQ
CZ8
CZ9
CZ4
CZ5
CZ6
CZ1
CZ2
CZ3
CZ12
CZ14

도면2


20 μM
5 μg/mL
10 μg/mL
25 μg/mL
50 μg/mL
Luciferase activity
(Fold Induction)
35
30
25
20
15
10
5
0
control
t-BHQ
CZ8
CZ9
CZ4
CZ5
CZ6
CZ1
CZ2
CZ3
CZ12
CZ14

도면3